

网络出版时间: 2019-5-9 10:22 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190506.1438.036.html>

◇技术与方法◇

五参数流式积分系统在骨髓增生异常综合征中的诊断价值

夏林欢, 王会平, 陶千山, 郭进京, 翟志敏

摘要 建立辅助骨髓增生异常综合征(MDS)诊断的五参数流式积分系统。应用多参数流式细胞仪,在传统CD34/CD19/CD33/CD45抗体组合基础上新加CD10/CD45抗体组合,回顾性分析320例因外周血细胞减少行骨髓穿刺检查患者骨髓流式参数,分为研究组与验证组,分别用于五参数流式积分系统的建立与验证。结果显示MDS与非MDS患者之间各参数表达有差异:髓系前体细胞比例明显升高,B系前体细胞比例降低,髓系前体细胞CD45平均荧光强度表达异常,粒细胞侧向角以及CD10平均荧光强度明显降低,分别确定cut-off值,赋予符合标准者每一参数1分,建立流式积分系统,以 ≥ 2 分诊断为MDS,敏感度达85.3%,特异度为87.7%。较传统四参数流式积分系统诊断准确性明显提高,因此改进的五参数流式积分系统可以更好地辅助MDS的诊断。

关键词 骨髓增生异常综合征;流式积分;诊断

中图分类号 R 551.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)05-0825-05

2019-01-10 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81670179)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院血液科,合肥 230601

作者简介:夏林欢,女,硕士研究生;

翟志敏,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: zzzm889@163.com

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.05.036

骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)是源于造血干细胞的髓系克隆性疾病,诊断上主要依靠骨髓细胞形态学和遗传学异常改变^[1-2],当患者骨髓细胞学原始细胞增多、典型的病态造血或者特异性染色体异常存在时,MDS的诊断相对比较简单明确,但仍有部分MDS患者缺乏特异性异常,导致临床诊疗困难。流式免疫分型可以很清楚的分辨细胞的异常表达,在骨髓恶性肿瘤的定性和定量诊断上起着越来越重要的作用,已有很多报道免疫分型在MDS诊断中的潜在价值,并推出多种流式积分系统应用于MDS的诊断和鉴别诊断^[3],但要么所需抗体多,成本高,分析步骤繁杂不易临床推广,要么敏感性和特异性尚不够理想,因此需要进一步摸索建立重现性和准确性好、简单易操作的MDS流式检测方法和诊断指标。

2009年Ogata et al^[4]首次开展多中心实验室研究MDS免疫表型特点并提出流式四参数积分系统,该研究结果初步提示用于诊断MDS方法快速简单,成本低,特异性较好,但敏感度欠缺(敏感度30%~

patients with ovarian endometriosis and infertility were enrolled, including 190 patients in the operation group and 163 patients in the non-surgical group. 402 patients with infertility due to tubal factors were randomly selected as the control group. Retrospective analysis three groups of patients received clinical data, pregnancy complications, and pregnancy outcomes during the treatment of frozen embryo transfer. **Results** The gonadotropin use in the ovarian endometriosis patients was higher than that in the control group ($P < 0.05$). The total number of eggs obtained, the number of eggs in the M II phase, the number of cleavage, and the number of embryos obtained were low. In the control group ($P < 0.05$), there was no significant difference between the surgical group and the non-surgical group ($P > 0.05$). The implantation rate and clinical pregnancy rate of the operation group were higher than those of the non-surgical group ($P < 0.05$). There was no significant difference in ectopic pregnancy rate, abortion rate and live birth rate between the three groups ($P > 0.05$). The incidence of preterm birth and gestational diabetes in the surgical and non-surgical groups was higher than that in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion**

Ovarian endometriosis cystectomy can improve the implantation rate and clinical pregnancy rate of EMS infertility patients with frozen embryo transfer, but there is no improvement in live birth rate.

Key words endometriosis; *in vitro* fertilization-embryo transfer; laparoscopic ovarian endometriosis cystectomy; clinical pregnancy rate; live birth rate

70%不等,特异度80%~90%以上^[4]),所以尚需要更多的临床研究予以证实或在此基础上进行优化改良。本课题组前期研究^[5]结果提示该积分系统对MDS的诊断有价值,但随着样本量的增加发现完全套用Ogata积分法误诊率较大,故在此基础上根据MDS粒细胞免疫表型特点增补一个新的积分参数:粒细胞与淋巴细胞CD10平均荧光强度比值,建立五参数流式积分系统,并对改良后的流式积分系统的分析方法和在MDS中的诊断价值进行了研究。

1 材料与方法

1.1 病例资料

回顾性分析2015年1月~2017年10月于安徽医科大学第二附属医院因外周血细胞减少行骨髓穿刺检查患者骨髓流式参数(排除重复病例、血液系统恶性克隆性疾病、免疫分型资料不全以及临床跟踪失访病例),共320例患者依照时间为节点,分为两部分:研究组140例(用于五参数流式积分系统的建立)和验证组180例(验证该积分系统的临床应用价值)。入选研究组病例初诊时均诊断明确(MDS的诊断根据2014版国内MDS诊疗专家共识标准),包括MDS患者34例(难治性贫血伴环形铁粒幼红细胞4例,难治性贫血伴单系病态造血2例,难治性贫血伴多系病态造血18例,难治性贫血伴原始细胞增多-1 8例,难治性贫血伴原始细胞增多-2 2例),其中男20例,女14例,年龄18~86岁,中位年龄62岁,非MDS患者106例(再生障碍性贫血9例,缺铁性贫血32例,免疫性血细胞减少41例,巨幼细胞性贫血18例,溶血性贫血6例),其中男64例,女42例,年龄15~87岁,中位年龄57岁;验证组初诊时包括29例MDS患者,86例非MDS患者,65例血细胞减少原因待查患者,经过临床至少6个月跟踪随访,最终诊断MDS患者31例,其中男19例,女12例,年龄26~83岁,中位年龄65岁;非MDS患者149例,其中男60例,女89例,年龄12~87岁,中位年龄55岁。

1.2 骨髓标本处理

骨髓标本2~5 ml经肝素抗凝,分别加入荧光素标记的CD34-FITC/CD19-PE/CD33-APC/CD45-PC7、CD10-FITC/CD45-PC7抗体组合,避光孵育,加入溶血素,磷酸缓冲盐溶液洗涤,上机检测^[5]。流式细胞仪及抗体购自美国Beckman-Coulter公司。

1.3 设门

1.3.1 CD34-FITC/CD19-PE/CD33-APC/CD45-PC7抗体组合的传统四参数分析

所有细胞表达在前向

角/侧向角(FSC/SSC)散点图上,设P1门去除细胞碎片及坏死细胞,代表全部有核细胞;P1门的细胞表达在CD34/CD45散点图上,CD34+CD45dim的细胞代表前体细胞群(P3门);P3门的细胞表达在CD19/CD33散点图上,CD34+CD19+CD33-的细胞代表B系前体细胞(P4门),CD34+CD33+CD19-的细胞代表髓系前体细胞(P5门);P1门中的细胞表达在CD45/SSC散点图上,P6门代表淋巴细胞,P7门代表粒细胞;分别读取髓系前体细胞与淋巴细胞的CD45平均荧光强度,淋巴细胞与粒细胞的侧向角峰值。见图1。

1.3.2 CD10-FITC/CD45-PC7抗体组合的新参数分析

所有细胞表达在FSC/SSC散点图上,设P1门代表全部有核细胞;P1门中的细胞表达在CD45/SSC散点图上,P2门代表淋巴细胞,P3门代表粒细胞;同时将P1门的细胞表达在CD10/SSC散点图上;分别读取淋巴细胞与粒细胞的CD10平均荧光强度。见图2。

1.4 分析参数

计算下列5个参数,参数1:全部有核细胞中髓系前体细胞所占百分比;参数2:前体细胞中B系所占百分比;参数3:淋巴细胞与髓系前体细胞CD45平均荧光强度的比值;参数4:粒细胞与淋巴细胞侧向角峰值的比值;参数5:粒细胞与淋巴细胞CD10平均荧光强度比值。流式分析软件EXPO 32 MultiComp software 购自美国Beckman-Coulter公司。数据分析者对病例的诊断和其他实验室数据不知情。

1.5 统计学处理

采用SPSS 19.0软件进行分析,定量资料符合正态分布采用 t 检验,不符合正态分布采用秩和检验,定性资料采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。应用受试者工作特征(receiver operating characteristic curve,ROC)曲线分析曲线下面积(area under curve,AUC),设立cut-off值,确定诊断为MDS的参考值范围。

2 结果

2.1 各参数统计学分析

研究组内包括34例确诊MDS患者和106例非MDS患者,两组患者中年龄、性别分布差异无统计学意义。MDS患者与非MDS患者相比:①参数1:髓系前体细胞占全部有核细胞比例明显升高;②参数2:前体细胞中B系比例明显降低;③参数3:淋巴细胞和髓系前体细胞CD45平均荧光强度的比值未见明显统计学差异,但均符合正态分布,这与Ogata积分系统结果一致,根据报

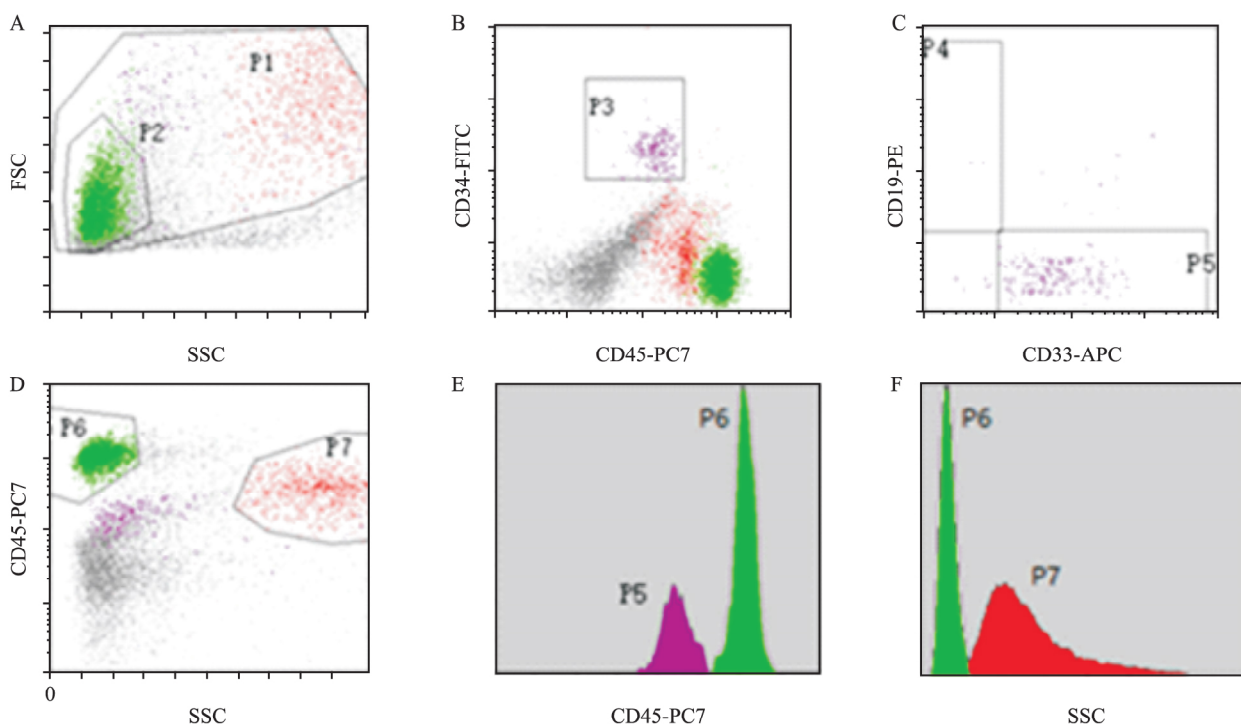


图1 CD34-FITC/CD19-PE/CD33-APC/CD45-PC7 抗体组合的传统四参数分析

A: FSC/SSC 散点图上显示全部有核细胞(P1 门); B: P1 门的细胞表达在 CD34/CD45 散点图上 ,P3 门为 CD34 + CD45dim 的细胞 ,代表前体细胞群; C: P3 门的细胞表达在 CD19/CD33 散点图上 ,P4 门为 CD34 + CD19 + CD33-的细胞 ,代表 B 系前体细胞 ,P5 门为 CD34 + CD33 + CD19-的细胞 ,代表髓系前体细胞; D: P1 门中的细胞表达在 CD45/SSC 散点图上 ,P6 门代表淋巴细胞 ,P7 门代表粒细胞; E: 淋巴细胞(P6)和髓系前体细胞(P5)的 CD45 平均荧光强度; F: 淋巴细胞(P6)和粒细胞(P7)的侧向角峰值

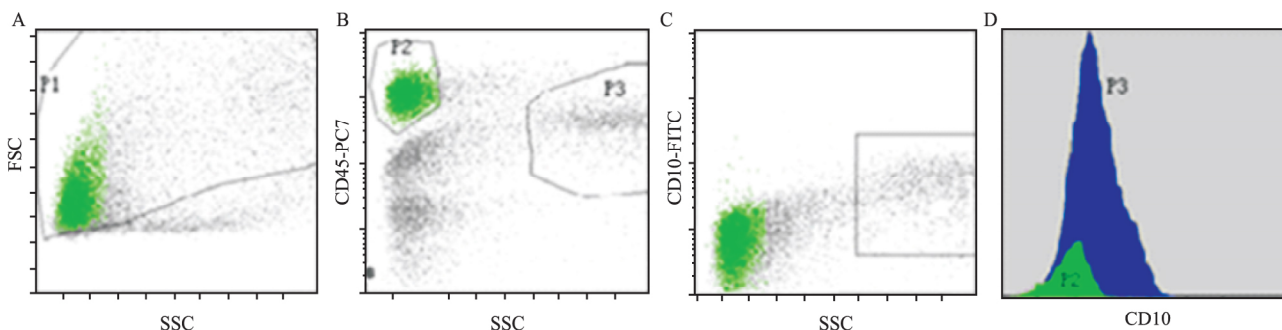


图2 CD10-FITC/CD45-PC7 抗体组合的新参数分析

A: FSC/SSC 散点图上显示全部有核细胞(P1 门); B: P1 门中的细胞表达在 CD45/SSC 散点图上 ,P2 门代表淋巴细胞 ,P3 门代表粒细胞; C: P1 门的细胞表达在 CD10/SSC 散点图上; D: 淋巴细胞(P2)和粒细胞(P3)的 CD10 平均荧光强度

道 MDS 患者 CD45 平均荧光强度与非克隆性血细胞减少患者相比分布有差异 ,比值高于或低于正常范围之外^[4] ,设立参考值范围为非 MDS 组均值 ± 2 个标准差($4.00 \pm 2 \times 1.50$) 之外 ,即 ≤ 1.0 或 ≥ 7.0 ;

④ 参数 4: 粒细胞和淋巴细胞侧向角峰值的比值明显下降;

⑤ 参数 5: 粒细胞和淋巴细胞 CD10 平均荧光强度的比值明显下降。见表 1。

2.2 五参数流式积分系统的建立与验证 在研究组中 ,改进的流式积分系统新添加了参数五: 粒细胞

与淋巴细胞 CD10 平均荧光强度比值 ,并且重新确立了 MDS 患者与非 MDS 患者间各参数的临界值 ,定义的各参数标准如下 ,参数 1: 全部有核细胞中髓系前体细胞所占百分比 $\geq 1.35\%$;参数 2: 前体细胞中 B 系所占百分比 $\leq 0.75\%$;参数 3: 淋巴细胞与髓系前体细胞 CD45 平均荧光强度的比值 ≤ 1.0 或 ≥ 7.0 ;参数 4: 粒细胞与淋巴细胞侧向角峰值的比值 ≤ 5.94 ;参数 5: 粒细胞与淋巴细胞 CD10 平均荧光强度比值 ≤ 3.15 ;每个参数符合上述标准计分为

表1 研究组中各参数表达(中位数与范围)及统计学分析

项目	MDS (n=34)	非 MDS (n=106)	Z/t 值	P 值	AUC	参考值范围
年龄	62(18~86)	57(15~87)	1.042	0.289	-	-
参数 1	1.15(0.04~10.50)	0.75(0.05~2.63)	-2.663	0.008	0.652	≥1.35
参数 2	0(0~10.00)	1.60(0~43.60)	-4.306	0.002	0.742	≤0.75
参数 3	4.17(1.80~11.70)	3.90(1.16~12.46)	-1.177	0.241	-	≤1.0 或 ≥7.0
参数 4	5.75(3.99~8.04)	6.80(3.60~8.81)	3.840	<0.001	0.700	≤5.94
参数 5	3.07(1.66~7.14)	3.91(1.92~10.90)	-3.582	<0.001	0.704	≤3.15

1 分,否则计分 0 分。若以 ≥2 分诊断为 MDS,研究组内敏感度为 85.3%,特异度为 87.7%,若以 ≥3 分诊断为 MDS,研究组内敏感度下降至 50%,但特异度达到 96.2%,达到 4 分均为 MDS 患者。定义 ≥2 分诊断 MDS,积分越高,诊断 MDS 误诊率越低。

再次用验证组验证上述积分系统的临床应用价值,31 例 MDS 患者有 27 例积分达到 2 分,敏感度为 87.1%,149 例非 MDS 患者中仅有 16 例达到 2 分,特异度为 89.3%,达到 4 分者均为 MDS;其中 3 例意义未明的血细胞减少患者跟踪随访过程中明确诊断为 MDS,均为流式积分 3 分,提示流式积分对疾病的早期诊断有一定的价值。见表 2。

2.3 改进五参数流式积分系统与传统四参数积分系统的比较 分别用两种积分系统对验证组中 180 例患者进行评分,若完全套用传统 Ogata 四参数积分法,敏感度为 77.4%(24/31),特异度仅为 69.1%(103/149)。采用配对四格表 χ^2 检验比较两种方法诊断效能,差异有统计学意义($\chi^2 = 13.581, P < 0.001$),改进的五参数流式积分系统对于 MDS 诊断的敏感度及特异度均较传统四参数积分系统明显提高。见表 3。

表2 研究组与验证组中患者的流式积分(n)

流式积分	研究组		验证组	
	MDS	非 MDS	MDS	非 MDS
	(n=34)	(n=106)	(n=31)	(n=149)
0 分	1	28	1	43
1 分	4	65	3	90
2 分	12	9	13	10
3 分	10	4	10	6
4 分	7	0	3	0
5 分	0	0	1	0
≥2 分	29	13	27	16

表3 两种积分系统的诊断结果比较(n)

四参数积分	改进五参数积分		合计
	MDS	非 MDS	
MDS	27	43	70
非 MDS	16	94	110
合计	43	137	180

3 讨论

到目前为止,骨髓细胞形态学和遗传学评估仍然是 MDS 诊断、分类、确定治疗方案以及评估预后的基础^[2],然而染色体异常(包括基因缺失和异位)大约仅在 50% 的 MDS 患者中可检测到,可作为异常克隆造血的依据,细胞形态学在确定 MDS 诊断上亦有不足,骨髓病态造血并不是 MDS 的特有标志,很多其他病理条件下也可出现^[6],并且同一标本不同操作者背对背分析可重现性差,骨髓片标本易受操作者制片、染色水平影响,最后,细胞形态学可能因部分患者骨髓细胞过少或骨髓纤维化而难以作出正确判断。近年来,WHO 提倡将流式细胞术免疫分型被作为血液肿瘤诊断、分类、分期和部分疾病监测不可或缺的工具,在 MDS 诊断上免疫分型可起重要辅助作用^[7]。

MDS 的克隆转化主要发生在 CD34+造血干细胞水平,以自我更新和分化异常导致细胞形态异常的病态造血为病理特征^[8]。MDS 患者较正常人前体细胞比例明显增高,并且向髓系分化为主。MDS 原始细胞的其他免疫表型异常亦有报道,包括干细胞和晚期髓系抗原的异常共表达(CD117、CD15 等)以及淋系抗原异常表达(CD2、CD5、CD7 等),但是这些流式参数实验室重现性差,除了淋巴细胞与髓系前体细胞的 CD45 比值,通过在同一流式通道中两者细胞之间的调整,在不同操作者之间分析结果差异小^[9]。粒细胞侧向角减小与骨髓原始细胞成熟障碍以及骨髓发育不良相关,粒细胞与淋巴细胞侧向角比值在 MDS 患者与非 MDS 患者之间存在差异^[10]。

综上所述,CD34+髓系前体细胞增多,B 系前体细胞减少,髓系前体细胞 CD45 的异常表达,粒细胞侧向角峰值和 CD10 平均荧光强度降低反映了 MDS 的生物学特征。本研究基于 Della Porta et al^[11]和 Bardet et al^[12]整合的 Ogata 四参数流式积分系统的多中心实验室研究结果,以及 MDS 患者粒细

胞 CD10 表达减少特点^[13],在此基础上新加一参数:粒细胞和淋巴细胞 CD10 平均荧光强度比值,并且结合各个参数的表达差异,重新设立参考值范围,改进的五参数流式积分系统在 MDS 诊断上具有很好的敏感度与特异度,在不同操作者之间可重现性好,且临床实用性强,易于解读,所用抗体组合价格不贵,在细胞学和遗传学无法给出确定诊断时,异常的流式积分有早期诊断价值,协助治疗方案的制定。

本实验可能存在样本量局限、标本采集不当及实验结果分析误差、实验缺乏国内多中心实验室结果验证等问题,需要更多的临床和实验室结果验证。

参考文献

- [1] Bejar R. Recent developments in myelodysplastic syndromes [J]. *Blood* 2014, 124(18): 2793–803.
- [2] Arber D A, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia [J]. *Blood* 2016, 127(20): 2391–405.
- [3] van de Loosdrecht AA. Cutting edge: flow cytometry in myelodysplastic syndromes [J]. *J Natl Compr Canc Netw* 2013, 11(7): 892–902.
- [4] Ogata K, Della Porta M G, Malcovati L, et al. Diagnostic utility of flow cytometry in low-grade myelodysplastic syndromes: a prospective validation study [J]. *Haematologica* 2009, 94(8): 1066–74.
- [5] 郭进京, 王会平, 熊术道, 等. 改进的流式细胞积分对骨髓增生异常综合征诊断价值的研究 [J]. *安徽医科大学学报* 2016, 51(6): 903–6.
- [6] Della Porta M G, Travaglino E, Boveri E, et al. Minimal morphological criteria for defining bone marrow dysplasia: a basis for clinical implementation of WHO classification of myelodysplastic syndromes [J]. *Leukemia* 2015, 29(1): 66–75.
- [7] Aanei C M, Picot T, Tavernier E, et al. Diagnostic utility of flow cytometry in myelodysplastic syndromes [J]. *Front Oncol* 2016, 6: 161.
- [8] Pellagatti A. The molecular pathogenesis of the myelodysplastic syndromes [J]. *Eur J Haematol* 2015, 95(1): 3–15.
- [9] Della Porta M G. Diagnostic utility of flow cytometry in myelodysplastic syndromes [J]. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2017, 9(1): 2017017.
- [10] Della Porta M G, Lanza F, Del Vecchio L. Flow cytometry immunophenotyping for the evaluation of bone marrow dysplasia [J]. *Cytometry B Clin Cytom* 2011, 80(4): 201–11.
- [11] Della Porta M G, Picone C, Pascutto C, et al. Multicenter validation of a reproducible flow cytometric score for the diagnosis of low-grade myelodysplastic syndromes: results of a European Leukemia-NET study [J]. *Haematologica* 2012, 97(8): 1209–17.
- [12] Bardet V, Wagner-Ballon O, Guy J, et al. Multicentric study underlining the interest of adding CD5, CD7 and CD56 expression assessment to the flow cytometric Ogata score in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms [J]. *Haematologica* 2015, 100(4): 472–8.
- [13] Mohadese Hashem B, Rajesh R, Sabariah M N. Qualitative flow cytometric analysis of Malaysian myelodysplastic syndromes (MDS) patients [J]. *Med J Malaysia* 2012, 67(1): 77–80.

Diagnostic value of five-parameter flow cytometry scoring system in myelodysplastic syndrome

Xia Linhuan, Wang Huiping, Tao Qianshan, et al

(Dept of Hematology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract To develop a five-parameter flow cytometry scoring system for the diagnosis of myelodysplastic syndrome (MDS). Using multiparameter flow cytometry, added a CD10/CD45 antibody combination based on the traditional CD34/CD19/CD33/CD45 antibody combination. Bone marrow flow parameters of 320 patients with reduced peripheral blood cells were analyzed retrospectively, divided into research group and validation group, which were used for the establishment and verification of five-parameter flow cytometry scoring system. Compared with non-clonal cytopenia patients, MDS had significantly increased myeloblast-related cluster size, decreased B-progenitor-related cluster size, expression of CD45 mean fluorescence intensity was abnormal in myeloblast-related cluster, the side scatter and CD10 mean fluorescence intensity in granulocytes was reduced significantly, and determine the cut-off value, one point was given for each parameter inside the reference range, when score 2 or more was defined as positive, the sensitivity and specificity in the research group was 85.3% and 87.7% respectively. Compared with the traditional four-parameter flow cytometry system, the diagnostic accuracy was significantly improved, so the improved five-parameter flow cytometry scoring system can better assist in the diagnosis of MDS.

Key words myelodysplastic syndrome; flow cytometry score; diagnosis